

モルモット結腸紐平滑筋の Carbachol 拘縮に対する Ruthenium Red の作用

川 村 勝

札幌医科大学外科学第1講座 (主任 早坂 滉教授)

藪 英 世 宮崎英策

札幌医科大学生理学第2講座 (主任 宮崎英策教授)

Effect of Ruthenium Red on the Carbachol Contraction of Guinea Pig Taenia Coli

Masaru KAWAMURA

Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. H. Hayasaka)

Hideyo YABU and Eisaku MIYAZAKI

Department of Physiology (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. E. Miyazaki)

The effect of ruthenium red (RR) on the Carbachol contraction of guinea pig taenia coli was observed.

The results obtained were as follows. Specifically, RR suppressed the late tonic component of Carbachol contraction. On the other hand, the agent did not show any inhibitory effect on Carbachol contraction occurring in a Ca free isotonic K solution.

These results suggest two possible explanations about the effect of RR. One of these is that RR does not affect Ca release from intracellular stored sites. The other explanation is that RR causes an inhibitory effect on inward Ca movement into intracellular space and by this movement, a large part of the tonic component of Carbachol contraction is formed.

(Received September 14, 1978 and accepted December 11, 1978)

1 序 論

先に Ishiyama *et al.*¹⁾ は neuraminidase (EC 3.2.1.18), またわれわれ^{2~4)} は ruthenium red (以下 RR と略す) 及び lanthanum (La^{3+}) 処理の影響をモルモット結腸紐の収縮性と Ca^{2+} 結合能につき観察し, 1) モルモット結腸紐平滑筋収縮時の外液中より細胞内への Ca^{2+} 流入機構には, 一部表面膜に局在するシアル酸残基が関与すること, 2) 等張 150 mM K^+ 拘縮経過中で Ca^{2+} 流入に関与する化学性残基が異なる—tonic component における Ca^{2+} 流入にはシアル酸残基が, phasic component にはシアル酸残基以外の化学性陰性残基が関与する—ことを推論した。

本報告では, モルモット結腸紐の Carbachol 拘縮に対する RR の影響を観察した。この実験意図は, 1) 上記の推論が薬物拘縮の場合にも妥当であるかどうか, 2) Ishiyama *et al.*¹⁾ は, neuraminidase 処理は ACh 拘縮の

phasic component に対し何ら抑制効果を示さないことを報告しているが, RR は抑制効果を示すかどうか, の二点にある。

2 実験方法

2.1 実験材料

体重 300~500 g のモルモットを断首, 放血後だちに結腸紐を剔出し, その筋条片標本を実験に供した。

2.1 使用実験液と使用法

剔出した標本をまず修正 Tyrode 液 (NaCl 139.3 mM, KCl 2.68 mM, NaHCO_3 11.8 mM, NaH_2PO_4 0.32 mM, MgCl_2 0.5 mM, glucose 8.0 mM, CaCl_2 1.36 mM の組成で, 95% O_2 と 5% CO_2 の混合ガス通気により pH 7.4 に調整) 中で室温 (20°C) 下に 1 hr 平衡させた。その後標本を tris-buffer 液 (NaCl 146.4 mM, KCl 2.68 mM, MgCl_2 0.5 mM, glucose 8.0 mM, CaCl_2 1.36 mM, tris (hydroxy-methyl) aminomethane-HCl buffer 5.0 mM

の組成で 100% O_2 通気により pH 7.5 に調整) 中で $37^\circ C$ 下に 1 hr 平衡させた後、この tris-buffer 液中で実験を開始した。なお等張 150 mM K^+ 液は上記 tris-buffer 液中の NaCl を KCl で等張性に置換して作製した。Ca(O)K 脱分極液は、等張 150 mM KCl 液中の Ca を除去することにより作製した。使用した Carbachol は最終濃度が 10^{-5} M となるように液槽に添加した。

2.3 張力測定

容量 5 ml の二重円筒型ガラス製恒温槽中 ($37^\circ C$) に tris-buffer 液を満たし、標本の一端を絹糸で浴槽底部に固定し、他端を mechanoelectronic transducer (SB-IHT 型, 日本光電) のアームに連結し、発生張力を等尺性に記録測定した。浴槽内の液は下部より 100% O_2 で通気した。

2.4 薬物および試薬

Carbachol, ruthenium red (RR) は半井化学の一級試薬を使用した。tris-aminomethane, その他の試薬は半井化学の特級試薬を用いた。

3 実験結果

1) モルモット結腸紐の Carbachol 拘縮に対する RR 前処理効果; 10^{-3} M RR で筋条片を前処理すると、その 10^{-5} M Carbachol による拘縮は明らかに抑制される (Fig. 1)。ただし、その抑制される経過は前処理時間により明らかに異なる。

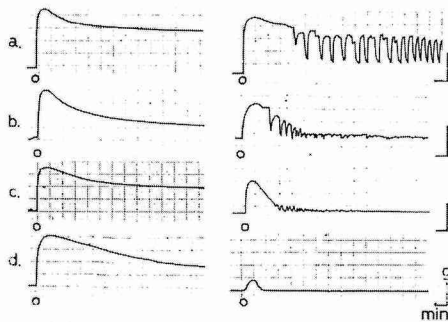


Fig. 1 Effects of ruthenium red on the Carbachol contracture of guinea pig taenia coli.

Initial contractures serve as controls. Tissues were treated in 10^{-3} M ruthenium red containing solution for a specified period of time. Then isotonic K contractures in the presence of ruthenium red were followed.

Taenia coli was treated for 5 min in a., 10 min in b., 30 min in c. and sixty min in d. recording, respectively, just before Carbachol contracture. Carbachol was applied at white circles (○).

Fig. 1 a —RR effect—に示すごとく、前処理 5 min では初めの急速な一過性の収縮相—phasic component (phasic comp. と略す)—はほとんど影響を受けないが、これに引き続くゆっくりとした収縮相—tonic component (tonic comp. と略す)—は明らかに作用を受ける。すなわち、tonic comp. は、RR 前処理によりある規則性を有する律動性の収縮に変換される。前処理時間を 10 min とすると、phasic comp. の最大収縮高の 20% 程度の抑制と、5 min 処理と同様に tonic comp. の律動性収縮への転換が起る。ただし、この場合律動性収縮の持続は一過性であり、4~5 min 後にはその消失と共にほぼ基線まで張力は低下する (Fig. 1 b)。さらに処理時間を 30 min まで延長すると phasic comp. は 40% ほど抑制され、最大張力を発生した後自発的に弛緩に転ずる (Fig. 1 c)。Fig. 1 a, 1 b にみられたような顕著な律動性収縮はもはや認められず、3 min 後には小さな且つ不規則な張力の動揺が 3~4 min 続き、基線にもどる。60 min 前処理では、phasic comp. は約 1/4 低下し (Fig. 1 d)、a および b において認められた律動性収縮はすでに認められない。

2) Carbachol 拘縮の tonic comp. に対する RR の作用; 等張 150 mM K^+ 拘縮 (K 拘縮と略す) 生起過程の tonic phase (生起後 6 min) で終濃度が 10^{-3} M となるように溶液中に RR を加えた。Fig. 2 a に示すごとく、左図 (control) に比較し、K 拘縮の tonic phase は時間経過と共にその張力を漸次低下している。このことは Kawamura

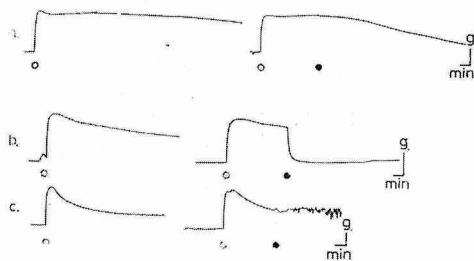


Fig. 2 Effects of ruthenium red on taenia coli's contractures induced by Carbachol and isotonic K solution.

- a. isotonic K contracture + 10^{-3} M RR
- b. 10^{-5} M Carbachol + 10^{-3} M RR
- c. 10^{-5} M Carbachol + 10^{-4} M RR

Three tracings in the left hand side serve as control. Ruthenium red (RR) was applied at black circles (●) and Carbachol or isotonic K solution was applied at white circles (○).

et al.^{2,3}) と Miyazaki *et al.*⁴) の同種の実験結果とその傾向は一致する。

Carbachol 拘縮の tonic comp. の経過中に RR を添加すると、その張力の急激な消失をもたらす (Fig. 2 b). この場合、終濃度が 10^{-4} M であると、抑制は余り著明でなく、不規則な律動性収縮を惹起するに至り、Fig. 1 における実験 (10~30 min 前処理) の tonic comp. に対する作用と類似する。

3) Ca(O)K 脱分極液中の Carbachol 拘縮に対する RR の作用; Ca(O)K 脱分極下の Carbachol 拘縮は、正常液中の Carbachol 拘縮に比べ、最大発生張力は $1/3 \sim 1/4$ ほどであり (Fig. 3 A-b), 4~5 min 後には基線まで弛緩する一過性のものである。

この Carbachol 拘縮は反復するごとに回を追って低下する。すなわち、二回目は一回目の $1/2$ の張力を、三回目は更に二回目の $1/2$ の張力と漸減して行く (Fig. 3 A-b, 3 A-c). 次に Fig. 3 B に示すごとく、Fig. 3 B-a を control とし Ca(O) 脱分極下の Carbachol 拘縮 (Fig. 3 B-b) は A と同様に control と比べ最大張力約 $1/3$ で、且つ一過性の Carbachol 拘縮が確認された。Fig. 3 B-b を control とし、RR 10^{-3} M, 30 min 処理すると二回目の Carbachol 拘縮は control に比べ $1/2$ の phasic な収縮が得られた。これは、Fig. 3 A の場合と比較すると、RR が何ら影響を与えていないことを示す。

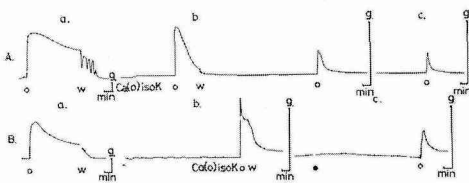


Fig. 3 Effects of ruthenium red on carbachol contracture in Ca^{++} free isotonic K solution.

Drugs were applied at white circles (Carbachol) or at black circles (ruthenium red). At w only Carbachol is washed out. Initial contractures in each tracing (a.) serve as controls. After control contractures, the tissues were immersed in Ca^{++} free solution for thirty min (between a.-b. tracings). Then, Ca^{++} free solution was replaced with Ca^{++} free isotonic K solution. Hereafter, experiments were carried out in this solution (b. and c.).

4 考 按

Ruthenium red (RR) は、従来組織の電子顕微鏡的観察の分野で、細胞外腔の標識物質として知られている。一方、生化学的にも種々の細胞内 organella の膜を介する Ca flux, また細胞表面膜への Ca 結合に対する修飾物質としても知られている mucopolysaccharide に親和性を有する物質である。

平滑筋の薬物拘縮は、一般に K 拘縮とは性質を異にし、収縮系を活性化するのに必要な Ca の origin を区別するのに、しばしばその性質が K 拘縮と対比させられている。

本報告では、モルモット結腸紐の Carbachol 拘縮に対する RR の影響を観察し、この物質が収縮にともなう Ca の動態のどのような過程に作用するかを検討しようとした。

Fig. 1 および Fig. 2 から、RR は Carbachol 拘縮に対し抑制的に作用することが明らかとなったが、その抑制作用は tonic comp. に著明であった。ただし、その作用は RR の作用時間、濃度に依存するらしい。

Carbachol 拘縮の Ca の origin については、現在なお不明な点が多いが、一般に K 拘縮よりも細胞内貯蔵 Ca に依存する可能性が大といわれている^{5~7})。Fig. 3 A-a, -b, -c に示す Ca(O)K 脱分極下の Carbachol 拘縮はこの点につき示唆的である。すなわち、外液 Ca は除去されているので、細胞外 Ca の流入は一応除外される。このことは筋を Ca(O) 液で洗滌すると Ca(O) , iso K 液により何ら収縮は起らないことで示される (Fig. 3 A-b, 3 B-b.). Carbachol 拘縮は一過性であり、おそらくこれは、細胞内の Ca を利用したものと思われる。これに対して RR は何ら抑制作用を示さなかった。すなわち RR は細胞内貯蔵 Ca を利用する収縮系には作用しないと思われる。これに対して、tonic comp. は外液 Ca に強く影響され (Fig. 3), RR の処理時間、濃度に依存して抑制される。したがって RR は、おそらく Carbachol 拘縮の tonic comp. を形成する Ca 流入機構に抑制的に作用したものと思われる。このことは、Kawamura *et al.*^{2~4}) の推論ならびに種々の細胞、organella で観察されている Ca 流入時の抑制現象とよく符合する。

RR は mucopolysaccharide agent であり、その作用機序は mucopolysaccharide のシアル酸残基とのターロン力による結合と考えられている。当教室では、筋細胞膜上のシアル酸残基の Ca 移動についての役割を分析するために、二つの方法を用いてきた。一つは、neuraminidase による酵素的分解除去 (Ishiyama *et al.*¹¹) であり、二つは、Kawamura *et al.*^{2,3}), Miyazaki *et al.*⁴) によるシア

ル酸に親和性の強い物質、例えば RR によるその作用の block である。両法によるシアル酸の除去および修飾は同一の実験結果をもたらすはずである。しかし、RR は Carbachol 拘縮の tonic comp. を抑制し (本報告)、neuraminidase 処理は ACh 拘縮に対して何ら抑制効果を示さなかった (Ishiyama *et al.*¹¹⁾).

この非平行の由来は種々考えられる。すなわち、1) RR はシアル酸以外にも関係して収縮を抑えるのではないか。2) 両実験で使用した agonist の種類および濃度が異なる。Ishiyama *et al.* は ACh, 10^{-2} M を、Kawamura *et al.* は Carbachol, 10^{-5} M を使用している。3) neuraminidase 処理は、結果として膜深層の新らしいシアル酸残基を露出させたのではないか。4) Ishiyama *et al.* は phasic comp. の peak のみに着目したが、実は tonic comp. には抑制効果を示したのではないか。両者の比較においてなお重要なことは、Ca(O)K 脱分極条件下の ACh 拘縮 (Ishiyama *et al.*) および Carbachol 拘縮 (本報告) は、前者は neuraminidase 処理、後者は RR によって何ら抑制されなかった事実である。このことは、表面膜上のシアル酸残基は細胞内貯蔵 Ca の薬物による release には何ら作用しないことを示している。且つ、このことは、本報告および前報^{2~4)}の実験成績を考慮すると、RR はシアル酸を block することにより Ca 流入を阻止し、種々の薬理学的効果を発したとみられる。

なお、Fig. 1a に示した RR 存在下に、tonic comp. の持続的な収縮が律動的収縮に変換して行く経過は、現象的には高濃度の Carbachol を使用したことにより、Carbachol 自身による生理的反応の不活化—脱感作 (desensitization) に起因する可能性がある。一方、類似の現象は taenia coli の ACh 拘縮に対する Ca blocker である D-600 の作用時に認められている^{8,9)}。したがって、RR の tonic comp. の抑制作用が受容体そのものか、Ca 流入の抑制によるか、desensitization によるかは収縮曲線のみからは判断することは早計であり、電気生理学的あるいは ⁴⁵Ca を用いた実験観察にその詳細をまつ必要がある。

5 結 語

モルモット結腸紐の Carbachol 拘縮に対する ruthenium red (RR) の影響を観察した。RR は Carbachol 拘

縮の tonic component を選択的に抑制した。一方、Ca(O)K 脱分極下の Carbachol 拘縮は一過性であり、これに対して RR は何ら抑制作用を示さなかった。

以上の結果より、細胞内の Ca を利用する収縮系には RR は作用しないものと思われる。これに対して、tonic component は外液 Ca に依存し、RR はその Ca 流入機構に抑制的に作用したものと思われる。

文 献

1. Ishiyama, Y., Yabu, H. and Miyazaki, E.: Changes in contractility and calcium binding of guinea pig taenia coli by treatment with enzymes which hydrolyze sialic acid. *Jap. J. Physiol.* **25**, 719-732 (1975).
2. Kawamura, M., Yabu, H. and Miyazaki, E.: Selective inhibition of isotonic K contracture of guinea pig taenia coli. *Proc. Intern. Union. Physiol. Sci.* **13**, 1103 (1977).
3. Kawamura, M., Yabu, H. and Miyazaki, E.: Selective inhibition of potassium contracture in guinea pig taenia coli by ruthenium red. *Jap. J. Physiol.* **28**, 447-460 (1978).
4. Miyazaki, E., Yabu, H., Sunano, S., Ishizawa, M. and Kawamura, M.: Calcium movement in the process of isotonic K-induced contracture of guinea pig taenia coli. *Jap. J. Smooth Muscle Res.* **14** (Suppl), 13-14 (1978).
5. Schild, H. O.: Calcium and the effects of drugs on depolarized smooth muscle. In: Bülbring, E.: *Pharmacology of Smooth Muscle*, 1st ed, 95-104, Pergamon Press, Oxford (1964).
6. 上村恭一: モルモット結腸紐平滑筋における諸種の収縮と細胞内外 Ca の寄与. *札幌医誌* **42**, 284-294 (1973).
7. 時田捷司: モルモット結腸紐平滑筋の収縮性, および Ca 動態に対する ethacrynic acid の影響. *日本生理誌* **39**, 389-404 (1977).
8. Mandrek, K. and Golenhofen, K.: Activation of gastro-intestinal smooth muscle induced by Ca ionophore. *Pflüg. Arch.* **371**, 119-124 (1977).
9. 葛西道生: アセチルコリン受容蛋白. 蛋白質, 核酸, 酵素 **22**, 566-571 (1977).